

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

EPIGENETIKA U PSIHIJATRIJSKIM BOLESTIMA
EPIGENETIC REGULATION IN PSYCHIATRIC DISORDERS
SEMINARSKI RAD

Andrea Babić

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

Zagreb 2017.

SADRŽAJ

1. UVOD	3
2. EPIGENETIČKI MEHANIZMI	4
2.1 KOVALENTNE MODIFIKACIJE HISTONA	4
2.1.1 Acetilacija histonskih repova	5
2.1.2 Metilacija histonskih repova	6
2.1.3 Ostale kovalentne modifikacije histona	6
2.2 KOVALENTNA MODIFIKACIJA DNA – METILACIJA	7
3. PSIHIJATRSKE BOLESTI	8
3.2 DEPRESIJA	8
3.1.1 Metilacija DNA u psihijatrijskim bolestima	8
3.1.2 Kovalentne modifikacije histona u psihijatrijskim bolestima	10
3.1 SHIZOFRENIJA	11
3.2.1 Metilacija DNA u shizofreniji	12
3.2.2 Kovalentne modifikacije histona u shizofreniji	13
3.3 OVISNOST O DROGAMA	15
4. ZAKLJUČAK	19
5. LITERATURA	21
6. SAŽETAK	29
7. SUMMARY	30

1. UVOD

Psihičko zdravlje podrazumijeva uravnoteženo stanje u kojem je individualac sposoban suočiti se sa životnim stresom i održavati odnose s drugim ljudima. Psihičko zdravlje jednako je važno kao i fizičko te razni faktori utječu na njega. Napredak u istraživanjima neurobiologije pokazali su da su psihijatrijske bolesti, kao i mnoge druge fizičke bolesti, rezultat kompleksne interakcije između bioloških, fizioloških i socijalnih faktora. Psihijatrijske bolesti univerzalni su problem svih zemalja svijeta te pogađaju 20-25% pojedinaca u nekom trenutku života. Najčešće psihijatrijske bolesti su veliki depresivni poremećaj (MDD), shizofrenija, bipolarni poremećaj i ovisnost o drogama. (WHO, 2000.)

Genetička istraživanja ovih bolesti otežana su zbog nedostatka pokazatelja bolesti, kao što su metaboličke, neuroendokrine, emocionalne ili kognitivne mjere, za točniju definiciju fenotipa bolesti. To su kompleksne bolesti koje su u agregirane u obiteljima, ali ne slijede Mendelova pravila nasljeđivanja slično srčano-žilnim bolestima, hipertenziji, raku i dijabetesu tipa I i II (Margolis i sur., 1999.). Nekoliko se razloga pripisuje nemogućnosti genetičkog mapiranja u identifikaciji gena odgovornih za psihijatrijske bolesti: poligenetički, multifaktorijalni uzroci; interakcije gena i okoliša; genetička heterogenost; epistaza; razlike u statističkim strategijama i etničkim razlikama u istraživanjima; i subjektivna dijagnoza (Mill i sur., 2008.).

Nepovezanost procjena nasljednosti i razmjera fenotipske varijacije koja se može objasniti razlikama u DNA sekvenci često se opisuje terminom „nasljednost koja nedostaje“ (eng. *missing heritability*) (Maher, 2008.). Zbog nemogućnosti povezivanja jednog, ili manjeg broja gena, s nastankom psihijatrijskih bolesti, istraživanja su preusmjerila pozornost na proučavanje epigenetičkih mehanizama regulacije aktivnosti gena. Sve veći broj istraživanja upućuje na značaj epigenetičkih promjena u određenim regijama mozga. Rezultati tih istraživanja ukazuju na uzročno-posljedičnu vezu između različitih psihosocijalnih i bioloških uzročnika nastanka psihijatrijskih bolesti s epigenetičkim mehanizmima regulacije aktivnosti gena.

Epigenetika podrazumijeva nasljedne promjene u ekspresiji gena koje nisu uzrokovane promjenom u DNA sekvenci (Waddington, 1942.). Epigenetičko svojstvo je stabilni fenotip koji je rezultat promjena u kromosomu i nasljeđuje se mitozom, ali moguće je da se prenosi i gametama u nekim slučajevima. Epigenetičke modifikacije uključuju razne mehanizme kao što su promjene u kromatinskoj strukturi (modifikacije histonskih proteina, kromatinsko

remodeliranje, histonske varijante, pozicijski efekt i mehanizmi koji uključuju male nekodirajuće RNA) i modifikacije DNA. Stanice različitih tkiva u organizmu razlikuju se u strukturi kromatina i uzorcima modifikacija DNA, pa se tako razlikuju i stanice različitih regija mozga. Ti su mehanizmi medijatori između okolišnih faktora i ekspresije gena pa stoga mogu ili povećati ili smanjiti rizik od obolijevanja od psihijatrijskih bolesti tijekom ranog djetinjstva i adolescencije. Upravo zato proučavanje interakcija između genotipa, epigenoma i okoliša s razvojne perspektive može odrediti prirodu pogrešne regulacije gena u psihijatrijskim bolestima.

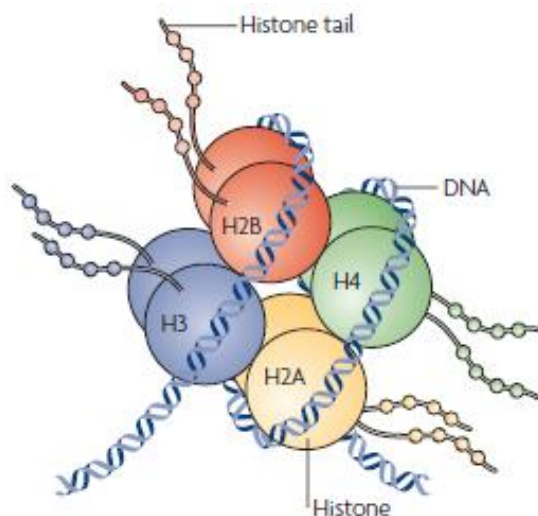
2. EPIGENETIČKI MEHANIZMI

Sve stanice nekog organizma imaju isti genom, odnosno istu sekvencu DNA, ali se razlikuju po svojem fenotipu i funkciji. U različitim tipovima stanica aktivan je podskup gena koji određuje fenotip i funkciju tih stanica. Osim različitih transkripcijskih faktora, epigenetički mehanizmi su uključeni u definiranje grupe gena koja je aktivna u određenom staničnom tipu. Kažemo da različiti stanični tipovi imaju isti genom, no različite epigenome čiji broj je jednak broju različitih staničnih tipova. Tijekom razvoja epigenetički mehanizmi određuju staničnu sudbinu, te zbog nasljeđivanja kroz stanične mitotske diobe održavaju stalan fenotip stanice.

Preklapajući epigenetički mehanizmi evoluirali su u eukariotskim stanicama kako bi pružili preciznu i stabilnu kontrolu genske ekspresije i regulacije genoma kroz veliki broj generacija. Dva su osnovna molekularna epigenetička mehanizma: regulacija komatinske strukture post-translacijskim modifikacijama histonskih proteina i kovalentna modifikacija DNA (Sweatt i sur, 2013.).

2.1 KOVALENTNE MODIFIKACIJE HISTONA

Histoni su bazični proteini čija je funkcija organizacija DNA u jezgri. DNA je u jezgri gusto pakirana u kromatin, DNA-proteinski kompleks koji se sastoji od DNA u dvostrukom heliksu, histonskih proteina i mnogih drugih, nehistonskih, uglavnom regulatornih proteina. Osnovna jedinica kromatina je nukleosom koji se sastoji od oktamera histonskih proteina (dvije kopije po svakom od histona 2A, 2B, H3 i H4) kojeg obavija dva navoja molekule DNA (Slika 1.).



Slika 1. Struktura nukleosoma. Preuzeto i prilagođeno od: Tsankova i sur., 2007.

Kondeziranost kromatina određuje transkripcijsku aktivnost DNA u čemu posreduju kovalentne modifikacije N-terminalnih repova histonskih proteina. Posttranslacijske modifikacije na histonima uljučuju fosforilaciju na serinskim ili treoninskim ostacima, metilaciju na lizinu ili argininu, acetilaciju, ubikvitinaciju i SUMOilaciju lizina, ADP-ribozilaciju te glikozilaciju na N-terminalnim deomenama repova histona koji izlaze iz nukleosoma i najpristupačnije su regije ovih peptida (Sweatt i sur, 2013.).

2.1.1 Acetilacija histonskih repova

Jedan od procesa posttranslacijske modifikacije histona je acetilacija, odnosno dodavanje acetilne skupine na lizinske ostatke C-terminalnog kraja histonskih repova. Acetilacija se povezuje s transkripcijskom aktivacijom. Posredovana je histonskim acetiltransferazama (HAT; npr. CREB-vezujući protein ili CBP) i histonskim deacetilazama (HDAC; npr. klasa I HDAC2).

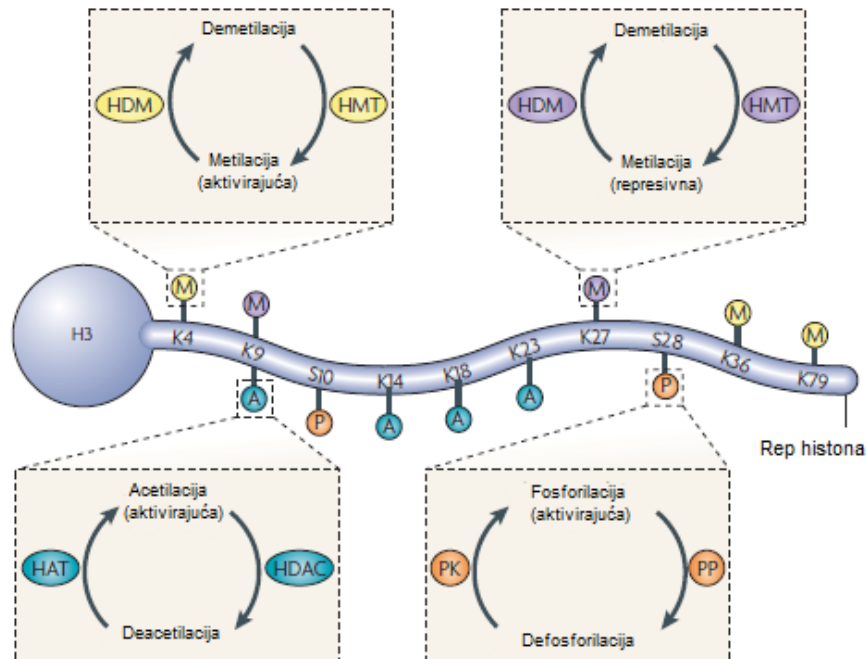
Primjerice, acetilacija histona H3 na lizinu 9 promotora gena se općenito povezuje s „otvorenom“ eukromatinskom strukturom i transkripcijskom aktivacijom. S druge strane, uklanjanje acetilne skupine (deacetilacija) enzimima HDAC je povezano sa „zatvorenom“ heterokromatinskom strukturom i utišavanjem gena (Slika 2.) (Sweatt i sur, 2013.)

2.1.2 Metilacija histonskih repova

Slično kao acetilacija, metilacija histona događa se na $\epsilon\text{-NH}^+$ skupini lizina (K) (Murray i sur., 1964.) i gvanidinskoj skupini arginina (R) i posredovana je histonskim metiltransferazama (HMT) (Slika 2.) (Paik i Kim, 1969.). Lizini se mogu metilirati na tri mjesta, te postojati u mono-, di- ili trimetiliranom stanju (Bannister i Kouzarides, 2004.). Ovisno o broju dodanih metilnih skupina, te o položaju aminokiseline na koju se metilacijska oznaka dodaje ona će imati represivno odnosno aktivirajuće značenje (Lachner i Jenuwein, 2002.).

2.1.3 Ostale kovalentne modifikacije histona

Fosforilacija histona na serinu (S) ili treoninu (T) povezuje se s aktivacijom transkripcije (Preuss i sur., 2003.) (Slika 2.). Uloga ubikvitilacije, SUMOilacije i ADP-ribozilacije su manje poznate (Strahl i Allis, 2000.). Raznolikost epigenetičkih mehanizama podupire “teoriju histonskog koda” (engl. *histone code hypothesis*) kojom se tvrdi da sve modifikacije na određenoj promotorskoj regiji definiraju specifično epigenetičko stanje aktivacije ili utišavanje gena. (Jenuwein i Allis, 2001.)



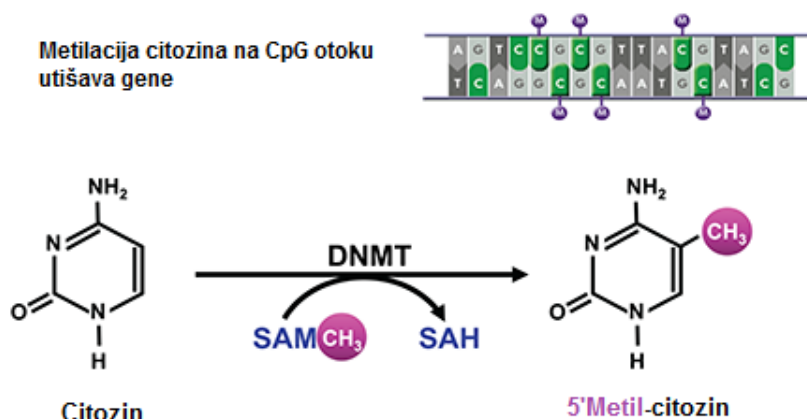
Slika 2. Epigenetički mehanizmi remodeliranja histona. HDM = histonska demetilaza, HMT = histonska metiltransferaza, HAT = histonska acetiltransferaza, HDAC = kompleks histonske

deacetilaze, PK = protein kinaza, PP = protein fosfataza, K = lizin, S = serin, M = metilna skupina, A = acetilna skupina, P = fosfatna skupina. Preuzeto i prilagođeno od: Tsankova i sur., 2007.

2.2 KOVALETNA MODIFIKACIJA DNA – METILACIJA

Metilacija DNA je proces kovalentnog dodavanja metilnih skupina na citozinske ostatke koji prethode gvaninima u sekvenci CpG dinukleotida, tj. CpG mjestima. U tom procesu sudjeluju DNA metiltransferaze (DNMT) koje kataliziraju prijenos metilne skupine sa S-adenozil-L-metionina (adoMet) na poziciju 5 citozina te nastaje 5-metilcitozin (5mC) (Law i Jacobsen, 2010.) (Slika 3). U sisavaca DNMT obitelj enzima uključuje 5 proteina: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B, i DNMT3L (Okano i sur, 1999.). Ovi su enzimi eksprimirani u središnjem živčanom sustavu i dinamično su regulirani tijekom razvoja i diferencijacije (Goto i sur., 1994.).

DNA metilacija promotora gena ili pojačivača često se povezuje s utišavanjem gena (Sutter i Doerfler, 1980.). Proteini koji se vežu i prepoznaju 5mC su proteini s metil-CpG vezujućom domenom (MBD). Oni neposredno reguliraju ekspresiju gena na taj način što regrutiraju enzime za modifikaciju histona kao što su HDAC i HMT koji svojom aktivnošću dovode do kompakcije kromatina i transkripcijske represije. Prema tome, metilacija DNA i metilacija i deacetilacija histonskih repova međusobno su usko povezani (Voltz i sur., 2012.). Posredni način na koji proteini MBD reguliraju ekspresiju gena je kompeticija s transkripcijskim faktorima – kada protein MBD prepozna i veže se za metilnu skupinu u molekuli DNA na to mjesto se više ne može vezati određeni transkripcijski faktor te je transkripcija onemogućena.



Slika 3. Metilacija DNA molekule. DNMT = DNA metiltransferaza, SAM = S-adenozilmetionin, SAH = S-adenozilhomocistein. Preuzeto od i prilagođeno od Zakhari, 2013.

3. PSIHIJATRSKE BOLESTI

3.2 DEPRESIJA

Depresija, odnosno veliki depresivni poremećaj (MDD, engl. *Major Depressive Disorder*), jedna je od najčešćih psihijatrijskih bolesti. Procjenjuje se da od nje u svijetu trenutno boluje oko 350 milijuna ljudi. Zbog porasta broja oboljeli postaje sve veći zdravstveni problema u svijetu. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>). Simptomi depresije uključuju emocionalne, kognitivne i somatske poremećaje. Uobičajeni simptomi su tjeskoba, smanjena životna energija, ideje o samoozljeđivanju ili samoubojstvu te anhedonija, nedostatak reaktivnosti na uobičajeno ugodnu okolinu (Bondy, 2002.).

Dijagnoza depresije oslanja se na procjenjivaju navedenih simptoma bolesnika, a ne na objektivnom laboratorijskom testu. Uzroci depresije istražuju se u neurobiokemijskim istraživanjima koji se fokusiraju na mehanizme kojima se regulira razina različitih neurotransmitera, ponajviše monoaminskih koji uključuju serotonin, dopamin i norepinefrin (Weiss i sur., 1981.). I neke druge molekule poput GABA-e, glutamata i histamina mogle bi biti uključene u nastanak depresije (Monteleone i sur., 1990., Trullas i Skolnick, 1990., Munari i sur., 2015.). Stoga nema jasnog dokaza o jednom jedinom neurotransmiteru koji bi mogao imati ključnu ulogu u nastanku depresije.

Cjelogenomske studije povezanosti (GWAS, od engl. *genome-wide association studies*) nisu identificirale niti jedan lokus koji bi se nedvojbeno mogao smatrati značajnim za objašnjenje etiologije depresivnog poremećaja (Wray i sur., 2012.). Sve veći broj istraživanja u području epigenetike upućuje na značaj epigenetičkih promjena u određenim područjima mozga.

3.1.1 Metilacija DNA u psihijatrijskim bolestima

Većina istraživanja koja su proučavala poveznicu između depresije i epigenetičkih promjena u ljudi bila su fokusirana na metilaciji DNA. Razlike u metiliranosti promotora određenih gena utvrđene su u oboljelima od depresije i zdravih pojedinaca. Ekspresija gena *Bdnf* (neurotrofni faktor mozga, eng. *brain-derived neurotrophic factor*) povezana je s metiliranošću njegovog promotora i uočena je njegova smanjena ekspresija kod oboljelih od depresije (D'Addario i sur., 2012.).

Metilacija promotora *BDNF* (točnije egzona I i IV) analizirani su u perifernoj krvi depresivnih i zdravih ispitanika koristeći MassARRAY metodu. Metilacijski uzorci razlikovali su se za promotor egzona I (Fuchikami i sur., 2011.). Stoga ovo istraživanje ukazuje da metilacija ove regije gena *BDNF* ima potencijal dijagnostičkog biomarkera za depresiju.

Sabunciyan i sur. proveli su prvu veliku studiju EWAS (od engl. *epigenome-wide association studies*) kojom je istražen poremećaj obrasca metilacije DNA iz frontalnog korteksa oboljelih od depresivnog poremećaja, u odnosu na kontrolu (Sabunciyan i sur., 2011.). Analizirano je ukupno 3,5 milijuna otoka CpG. Na temelju povećane razine metilacije molekule DNA (više od 10%), otkrivena su 224 razlikovno metilirana područja (DMR, od engl. *Differentially Methylated Region*). Najveća razlika u metiliranosti molekule DNA otkrivena je u području gena *PRIMA1* (od engl. *Proline Rich Membrane Anchor 1*). Metiliranost tog gena je 12 – 15 % viša u oboljelih u odnosu na kontrolu. Sukladno tome, ekspresija gena *PRIMA1* smanjena je u uzorcima mozga oboljelih od depresivnog poremećaja (Sabunciyan i sur., 2011.).

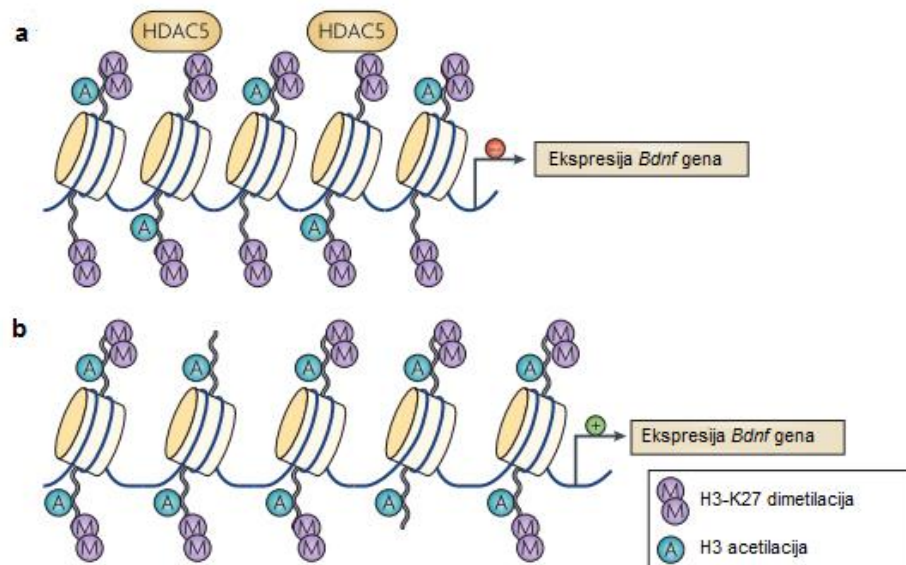
Uloga istoimenog proteina je transport acetilkolinesteraze (AChE) do neuronskih staničnih membrana i njezino uklapanje u membranu (Perrier i sur., 2002.). Snižena razina *PRIMA1* pridonosi smanjenju lokalizacije acetilkolinesteraze u membranu te i njenoj smanjenju funkcije. Budući da AChE hidrolizira acetilkolin, njena smanjena aktivnost povećava kolinergički prijenos te rezultati ovog istraživanja podupiru hipotezu o povećanom kolinergičkom prijenosu kao centralnom mehanizmu u depresivnom poremećaju (Janowsky i sur., 1972.).

U jednom od EWAS istraživanja, kojima je cilj bio identifikacija metilacijskih oznaka koje razlikuju oboljele od depresivnog poremećaja i zdrave kontrole, ispitan je metilacijski profil perifernih leukocita. Od 431489 analiziranih CpG otoka značajna razlika u metilaciji DNA opažena je unutar 363 otoka. (Numata i sur., 2015.) Najznačajniji diferencijalno metilirani gen bio je *GSK3B* koji se povezuje s depresivnim poremećajem i s primjenom antidepresiva. Smanjena metilacija tog gena uzrokuje njegovu povećanu ekspresiju u krvi oboljelih od depresivnog poremećaja (Oh i sur., 2010.).

3.1.2 Kovalentne modifikacije histona u psihijatrijskim bolestima

Uz metilaciju DNA u patogenezi depresivnog poremećaja dokazan je značaj posstranslacijskih modifikacija histona. U jednom istraživanju korišten je životinjski model depresije sa specifičnim endofenotipom depresije „kroničnog socijalnog stresa“ (engl. *chronic social defeat*). Endofenotip predstavlja genetički determinirani fenotip povezan s proučavanom bolešću i pomaže u istraživanjima kompleksnih bolesti (Greenwood i sur., 2007.). U tom modelu životinja je bila izložena više agresivnoj životinji iste vrste nakon čega dolazi do izbjegavanja kontakta s agresorom (Berton i sur., 2006). U miševa, takvo socijalno izbjegavanje rezultiralo je povećanjem razine oznake H3K27me2 koja ima represivno značenje i posljedičnom smanjenju ekspresije hipokampusnog gena *Bdnf*-a (*Bdnf* III i IV) (Tsankova i sur, 2006.). Promjena histonskih modifikacija ostala je stabilna 4 tjedna nakon prestanka stresa i nisu se revertirale antidepresivnim liječenjem (imipraminom). Prema tome, kronični socijalni stres stvara dugotrajni biljeg represije promotera *Bdnf* (Slika 3a).

Duža primjena imipramina revertira represiju gena *Bdnf* na taj način što potiče acetilaciju histona H3 i te metilaciju histona H3-H4 na promotorima čime se aktivira ekspresiju *Bdnf*. Sukladno tome, primjena imipramina smanjuje ekspresiju gena *Hdac5* u hipokampusu kod životinja prethodno izloženima kroničnom socijalnom stresu. Zato je natrijev butirat, nespecifični inhibitor enzima HDAC, predložen kao antidepresiv u modelima depresije, uključujući u model socijalnog stresa (Slika 3b) (Tsankova i sur., 2006.).



Slika 3. Regulacija gena *Bdnf* u modelu socijalnog stresa. *Bdnf* = neurotrofni faktor mozga, HDAC5 = kompleks histonske deacilaze 5, A = acetilna skupina, M = metilna skupina, H3-K27 = lizin na 27. mjestu histonskog proteina 3. Preuzeto i prilagođeno od: Tsankova i sur., 2007.

Razlika u acetilaciji histona također je ispitana kod oboljelih od depresije. Povišena razina mRNA za deacetilaze histona 2 i 5 (HDAC2 i HDAC5) utvrđena je u perifernoj krvi oboljelih od depresivnog poremećaja u odnosu na kontrolnu skupinu (Hobara i sur., 2010.).

Rezultati istraživanja u ljudi i životinjskih modela sugeriraju da antidepresivno liječenje revertira ili pojačava epigenetičke promjene kao što su histonska hiperacetilacija i DNA hipometilacija koje potiču prethodno smanjenu gensku ekspresiju. Veće razumijevanje epigenetičkih mehanizama u antidepresivnom liječenju obećava razvoj novih lijekova za depresiju, kao što su inhibitori HDAC i DNA metiltransferaza (Covington i sur., 2009.; Tadić i sur., 2014.).

3.1 SHIZOFRENIJA

Shizofrenija je bolest koju karakteriziraju „pozitivni“ simptomi kao što su deluzije, halucinacije, poremećen slijed misli i „negativni“ simptomi kao što su asocijalnost, anhedonija, smanjena motivacija i izbjegavanje socijalnih aktivnosti. Shizofrenija je agregirana u obiteljima i kvantitativna genetička analiza ističe njezinu visoku nasljednost koja se procjenjuje od 70% do 80% (Sullivan i sur., 2003.; Gejman i sur., 2010.). Unatoč tome, sličnost između monozigotnih

blizanaca manja je od 100% što ukazuje na druge, negenetičke faktore važne u etiologiji ove bolesti. Zato se sve više stavlja naglasak na epigenetičku disfunkciju u istraživanjima etiologije shizofrenije (Dempster i sur., 2011.).

3.2.1 Metilacija DNA u shizofreniji

Mnoga istraživanja ukazuju na epigenetičke mehanizme uključene u patogenezu shizofrenije. Jedno od istraživanja pokazalo je epigenetičke promjene u promotoru gena *RELN* (Tamura i sur., 2007.). Reelin je glikoprotein koji je eksprimiran tijekom razvoja i u odraslih neurona koji sadrže GABA-u (μ -aminobutirinska kiselina) i važan je za pravilno smještanje neurona tijekom razvoja mozga (Niu i sur., 2004.). *Post-mortem* istraživanja bolesnika sa shizofrenijom ukazuju na značajno smanjenje ekspresije gena *RELN*-a u nekoliko regija mozga. Promotor ovog gena sadrži CpG otok što ukazuje na važnost metilacije DNA u regulaciji ekspresije tog gena (Guidotti i sur., 2000.).

Još jedan protein važan u GABA-ergičkom sustavu mozga je glutamat dekarboksilaza 67 (GAD_{67}), proteinska izoforma kodirana genom *GADI*, koja sintetizira neurotransmiter GABA-u. Disregulacija u neuralnom prijenosu posredovanom GABA-om uključena je u patofiziologiju shizofrenije (Torrey i sur., 2005.). Razina mRNA kao i proteina gena *GADI* smanjena je u prednjem mozgu bolesnika (Guidotti i sur., 2000.). DNMT1 metilira CpG otoke u promotorima *GADI* i *RELN* te se posljedično smanjuje transkripcija tih gena (Noh i sur., 2005.). Povećana metilacija obrnuto je povezana s razinom ekspresije HDAC1 što ukazuje na povezanost između acetilacije histona i metilacije DNA (Sharma i sur., 2008.).

Također, povećana metilacija CpG otoka u promotorskoj regiji oligodendrocit-specifičnog faktora *SOX10* i smanjena razina mRNA *SOX10* gena uočeni su u mozgu bolesnika sa shizofrenijom (Iwamoto i sur., 2005.). Ove se promjene također se povezuje s povećanom ekspresijom enzima DNMT1. Nakon primjene 1-metionina, prekursora potrebnog za aktivnost DNMT1, štakori su pokazivali simptome nalik shizofreniji što potvrđuje povezanost tog enzima sa shizofrenijom (Gavin i Sharma, 2010.).

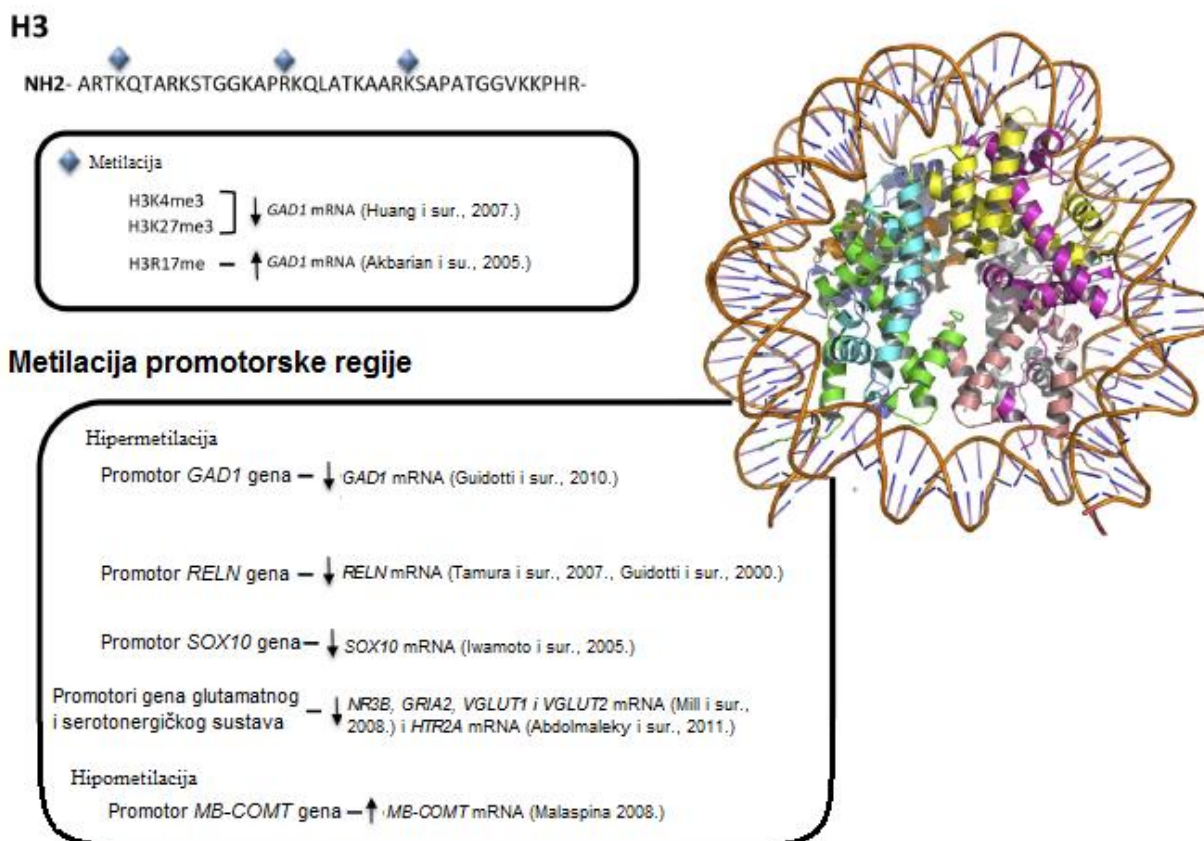
Epigenetičke promjene dopaminergičkog sustava također se smatraju važnima u patofiziološkim mehanizmima shizofrenije. Važan enzim tog sustava je COMT koji degradira katekolamine, odnosno molekule dopamina, adrenalina i noadrenalina. Delecija gena *COMT*

dovodi do DiGeorge sindroma kojeg karakterizira psihoza. COMT je važan za metabolizam dopamina u prefrontalnom korteksu, regiji mozga bitnoj za radnu memoriju čija se disfunkcionalnost povezuje sa shizofrenijom (Callicott 2000.). Promotor gena izoforma tog proteina, *MB-COMT* (eng. *Membrane-Bound COMT*), hipometiliran je lijevom frontalnom režnju u oboljelih od shizofrenije u odnosu na kontrolu (Abdolmaleky i sur., 2006.) (Slika 4.).

Od gena uključenih u glutamatergičnom i serotonergičnom sustavu istaknuli su se geni glutamatanih receptora NR3B i GRIA2, glutamatnog transportera VGLUT1 i 2 (Mill i sur., 2008.) i serotonergičkog receptora HTR2A (Abdolmaleky i sur., 2011.). U uzorcima oboljelih od shizofrenije CpG otoci promotora tih gena bili su hipometilirani (Slika 4.).

3.2.2 Kovalentne modifikacije histona u shizofreniji

Različite histonske modifikacije mogu se karakterizirati kod oboljelih od shizofrenije. Razina metilacije histona u određenim lokusima razlikuje se između pacijenata i zdravih kontrola. Primjerice, povećanje razine oznaka H3R17me (metilacija Arg na poziciji 17 histona H3) i smanjenje oznake H3K4me3 i H3K27me3 (metilacija Lys na pozicijama 4 i 27 histona H3) u lokusu *GAD1* povezano je sa smanjenjem razine *GAD1* mRNA u *post-mortem* uzorcima prednjeg mozga bolesnika sa shizofrenijom (Huang i Akbarian., 2007., Akbarian i sur., 2005.) (Slika 4.).



Slika 4. Epigenetičke modifikacije gena *GAD1*, *RELN*, *SOX10*, *NR3B*, *GRIA2*, *VGLUT1*, *VGLUT2*, *HTR2A* i *MB-COMT* u shizofreniji. Preuzeto i prilagođeno od: Martinez i sur., 2016.

Enzimi koji skidaju i dodaju kovalentne grupe na histonske repove, posebice oni iz obitelji histonskih deacilaza (HDAC), tema su mnogih istraživanja uključenosti epigenetičkih mehanizama u psihijatrijske bolesti. U oboljelih od shizofrenije izmjerena je smanjena razina transkripta HDAC2 u dorzolateralnom prefrontalnom korteksu *postmortem* uzoraka u odnosu na zdrave kontrole (Schroeder i sur., 2017.). Prijašnja su istraživanja ukazala na povišenu mRNA ekspresiju enzima HDAC1 u prefrontalnom korteksu *postmortem* uzoraka. Povišena razina HDAC povezuje se sa sniženom ekspresijom gena *GAD1* (Sharma i sur., 2008.).

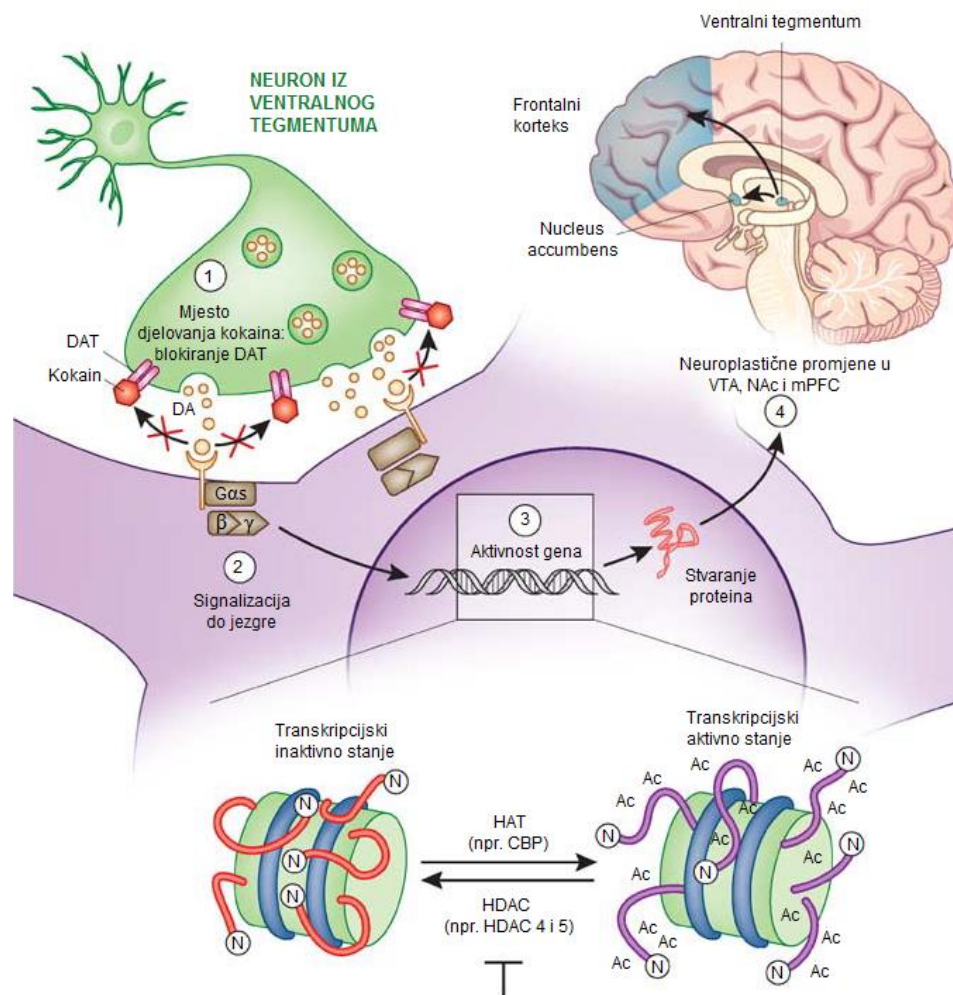
Istraživanja su pokazala da primjena psihotropnih lijekova potiče epigenetičke promjene u mozgu bolesnika. Primjerica, liječenje inhibitorom HDAC, valproatom, rezultira smanjenjem aktivnosti enzima HDAC i povećanjem ekspresije reelina zbog smanjene metilacije promotorske regije gena *RELN*-a (Chen i sur., 2002.). Također, dva antipsihotika koji se ponašaju kao antagonisti dopamin D2 receptora, haloperidol i rakloprid, potiču fosforilaciju serina na poziciji

10 3 i acetilaciju lizina na poziciji 14 histona H3 (H3S10phos/K14ac) u prefrontalnom korteksu mozga miševa (Li i sur., 2004.).

3.3 OVISNOST O DROGAMA

Ovisnost o drogama definira se kao kronična bolest s recidivom koja preuzima kontrolu nad centrima nagrade u mozgu uključujući mezolimbčki dopaminski sustav (Everitt i Robbins, 2005.). Istraživanja ovisnosti u području epigenetike pokušavaju razumjeti varirajuće farmakološke efekte droga s obzirom na životne uvjete i okolinu, te koliko socijalni stres utječe na konzumaciju droga i kojim genima je promijenjena ekspresija nakon primjene droga.

Jedno od primarnih molekularnih djelovanja kokaina je da blokira presinaptičke dopaminske transportere (DAT) u mezolimbickom „putu nagrade“ mozga koji uključuje ventralni tegmentum (VTA), *nucleus accumbens* (NAc) i prefrontalni korteks (PFC) (Ritz i sur., 1987.) (Slika 5). Aktiviranjem receptora DA stimulira se unutarstanična signalna kaskada u kojoj se aktiviraju HAT čime se mijenja ekspresija gena. Time se događaju neuroplastične promjene u VTA, NAc i PFC uslijed primjene kokaina. Induciraju se promjene u razinama mRNA u u tim područjima i neke od tih promjena ostaju nekoliko mjeseca nakon apstinencije (Lu i sur., 2003.). Dugotrajnost tih promjena ukazuje na važnost utjecaja kromatinskog remodeliranja na ekspresiju gena u centrima za nagradu mozga (Ito i sur., 2004.).

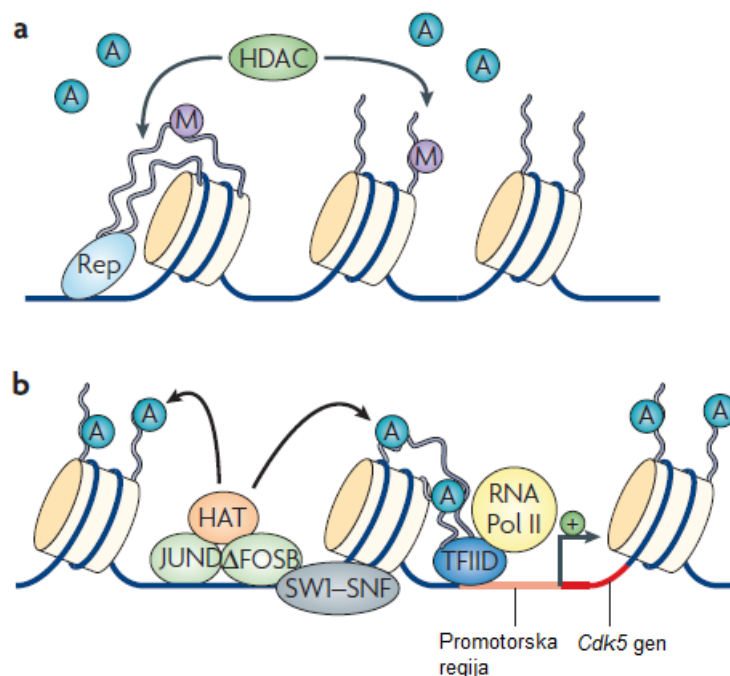


Slika 5. Transkripcijski-ovisna neuroplastičnost uzrokovana kokainom u „putu nagrade“. DAT = dopamin receptori, DA = dopamin, VTA = ventralni tegmentum, NAc = nucleus accumbens, mPFC = medijalni refrontalni korteks, HAT = histonska acetiltransferaza, CBP = CREB-vezajući protein, Ac = acetilna skupina, HDAC = kompleks histonskih deacetilaza, N = amino-kraj. Preuzeto i prilagođeno od: Rogge i Wood, 2013.

Akumulacija Δ fosB pokazala se važnom u stvaranju ovisnog ponašanja kod glodavaca (Kelz i sur., 1999.). Ekspresija gena *fosB* posredovana je povećanom razinom dopamina u centrima za nagradu mozga inducirana primjenom kokaina. Dopamin potiče sintezu cAMP-a preko receptora D1 i cAMP aktivira PKA. Ova kinaza fosforilira CREB, konstitutivni transkripcijski faktor, koji veže faktor CBP. CBP acetilira histone dovodeći do dekonenzacije DNA i indukcije gena *fosB* (Levine i sur., 2005.).

Regulacija ekspresije gena pri kroničnoj primjeni kokaina razlikuje se od one pri samoprimjeni. Gen *FosB*, primjerice, induciran je akutnom i kroničnom primjenom kokaina, ali akutna primjena uzrokuje acetilaciju histona H4, dok kronična primjena uzrokuje većinom acetilaciju histona H3. Geni *Cdk5* i *Bdnf* se acetiliraju na histonu H3 tijekom kronične primjene. Indukcija acetilacije na promotoru *Bdnf* gena povećava se u razdoblju neuzimanja droge i prethodi progresivnom povećanju količine proteina BDNF i razine mRNA ovoga gena (Kumar i sur., 2005.).

Kromatinsko imunoprecipitacijski (ChIP) testovi pokazali su da Δ FOSB ima direktan, aktivirajući afekt na *Cdk5* gen, odnosno povećava se njegova ekspresija (Slika 6.). U represivnom stanju, mjesno-specifični represor (Rep) na kromatinu potiče uklanjanje acetilne skupine s histonskih amino-krajeva posredovano kompleksom HDAC. U aktivnom stanju induciranom kokainom, transkripcijski faktor (primjerice, dimer aktivatora proteina 1 sastavljen od Δ FOSB-JUND) potiče acetilaciju histonskih repova posredovanu kompleksom HAT te kromatinsko remodeliranje posredovano kromatin-remodelirajućim kompleksom iz porodice SWI/SNF. Ta reakcija olakšava vezanje transkripcijskih faktora i bazalnog transkripcijskog kompleksa (primjerice, TFIID i RNA polimeraza II) za promotor (Kumar i sur., 2005.). Za usporedbu, *Bdnf* nije direktna meta Δ FOSB ukazujući na drugačiji mehanizam indukcije tog gena. Ovi zaključci podržavaju model u kojem je akumulacija Δ FOSB u interakciji s faktorima kromatinskog remodeliranja na specifičnim promotorima kako bi se regulirali geni važni za razvoj i održavanje ovisnosti.



Slika 6. Kromatinsko remodeliranje pod utjecajem kokaina. Rep = mjesno-specifični represor, HDAC = kompleks histonske deacetilaze, A = acetilna skupina, M = metilna skupina, HAT = histonska acetiltransferaza, SWI1-SNF = kromatinski remodelirajući kompleks, ΔFOSB-JUND = dimer aktivatorskog proteina 1, TFIID = transkripcijski faktor IID, RNA Pol II = RNA polimeraza II, Preuzeto i prilagođeno od: Tsankova i sur., 2007.

Istraživanja utjecaja apstinencije na ekspresiju gena pokazala su povećanu razinu acetilacije, točnije H3K9/14ac, u centrima za nagradu u mozgu štakora (Rogge i Wood, 2013.). Samoprimjena kokaina i apstinencija od 7 dana povećava količinu H3K9/14ac na *Bdnf IV* promotoru u medijalnom prefrontalnom korteksu mozga štakora te se povećava ekspresija tog gena (Sandri-Vakili i sur., 2010.). Također, H3K9/14ac se povećava u promotoru gena *Npy* u medijalnom prefrontalnom korteksu (mPFC) štakora (Freeman i sur., 2010.).

Opažena je povećana razina *Brd1* mRNA nakon primjene kokaina i rane apstinencije (Sadakierska-Chudy i sur., 2017.). Brd1 je protein koji je dio acetil-transferaznog kompleksa koji potiče acetilaciju histona H3 i H4 (Fryland i sur., 2016.). Važan je za transkripcijsku regulaciju u mozgu i sinaptičku plastičnost na što je ukazala povezanost polimorfizma *Brd1* gena sa shizofrenijom i bipolarnim poremećajem (Severinsen i sur., 2006.).

Slično kao i kod primjene kokaina, izloženost alkoholu povećava aktivnost HAT te acetilaciju histona i dimetilaciju u promotorskoj regiji gena *cFos*, *Cdk5* i *FosB* u prefrontalnom korteksu štakora (Pascual i sur., 2012.). Anksiolitički efekti alkohola povezani su sa smanjenjem aktivnosti HDAC i povećanjem razine ekspresije gena *CBP* i *NPY*. Sukladno tome, anksiozno ponašanje tijekom razdoblja bez alkohola povezano je s povećanjem aktivnosti HDAC te smanjenjem acetilacije histona H3 i H4, odnosno smanjenjem razine proteina CBP i NPY u amigdali. Primjena inhibitora HDAC enzima, kao što je Trihostatin A, pokazala je blokiranje njegove aktivnosti i posljedično smanjenje razine acetilacije histona H3 i H4 te održavanje normalne razine NPY mRNA i njezinog proteinskog produkta u amigdali. Time se smanjila aksizonost povezana s apstinencijom od alkohola kod štakora (Pandey i sur., 2008.).

Istraživanje Kazantsev i Tompson (2008) pokazalo je da je aktivnost HDAC također povećana u područjima mozga PFC i NAc štakora nakon primjene kokaina. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na veliku važnost HDAC, posebice HDAC5, kao potencijalnog antidepresiva (Kazantsev i Tompson, 2008.). Također, ukazuje na specifičnost odgovora u HDAC tijekom kronične primjene kokaina što ukazuje na uključenost epigenetičkih mehanizama u prijelazu od rekreacijskog uzimanja droge do kompulzivnog. Inhibitori histonskih deacetilaza pokazali su se kao potencijalna terapija u liječenju psihijatrijskih bolesti te se razmatraju i kao lijekovi koji sprečavaju ponovno uzimanje droge nakon apstinencije (Romieu i sur., 2008.).

4. ZAKLJUČAK

Niz istraživanja koja uključuju EWAS studije, upotrebu sekvenciranja, metode *microarray*, te imunotipizaciju, dokazala su važnost epigenetičke regulacije u neuralnom razvoju, ali i u neuralnoj plastičnosti potpuno diferenciranih neurona. Uključenost epigenetičke regulacije mnogih gena u patofiziologiju psihijatrijskih bolesti dokazana je postojanjem znatnih epigenetičkih promjena u bolesnika u usporedbi sa zdravim kontrolama.

Na temelju dosadašnjih saznanja moguće je zaključiti da nastanak psihijatrijskih bolesti ovisi o mnogim čimbenicima, od genetike jedinke do raznih okolišnih faktora koji interagiraju s genotipom pomoću epigenetičkih mehanizama, te sve zajedno može potaknuti brojne psihopatološke mehanizme. Unatoč visokoj nasljednosti shizofrenije (Cardno i sur., 1999.) i depresije (Kendeler i Prescott, 1999.), pokazano GWA studijama, mutacije (SNP-ovi, od engl.

single nucleotide polymorphisms) su odgovorni samo za mali dio ukupnog genetičkog rizika za ove bolesti (Dick i sur., 2010.). Epigenetički mehanizmi mogli bi pridonijeti puno većem razumijevanja tih bolesti i njihove etiologije te pomoći u razvoju novih terapija.

Mnogo je izazova u traženju epigenetičke terapije za psihijatrijske bolesti. Jedan od problema u istraživanjima je heterogenost, odnosno ispitivanje na različitim tkivima (bukalna slunica, krv) ili različitim regijama mozga. Također, korištene epigenetičke metode različite su osjetljivosti i rezolucije te je reproducibilnost rezultata dosadašnjih studija nedovoljno dobra. Osim toga, mala veličina uzoraka pridonosi manjem statističkom značaju dobivenih rezultata. Zbog navedenog teško je izvesti konkretan zaključak o utjecaju epigenetičkih promjena u psihijatrijskim bolestima.

Primjerice, u Tablici 1 prikazan je samo dio do sada poznatih epigenetičkih modifikacija uključenih u depresiju. Različiti pristupi u istraživanju psihijatrijskih bolesti objašnjavaju i samu raznolikost rezultata te otkrivaju povezanost sve većeg broja gena i molekularnih mehanizama s patofiziologijom psihijatrijskih bolesti.

Tablica 1. Epigenetičke modifikacije uključene u depresiju.

Gen	Epigenetička modifikacija	Vrsta organizma	Tkivo	Metoda	Referenca
<i>Bdnf</i>	Metilacija H3K27me2	Miš	Hipokampus	ChIP	Tsankova i sur., 2006.
<i>BDNF</i>	Metilacija	Čovjek	Krv	MassARRAY	Fuchikami i sur., 2011.
<i>PRIMA1</i>	Metilacija DNA	Čovjek	Frontalni korteks	EWAS	Sabunciyan i sur., 2011.
<i>GSK3B</i>	Metilacija	Čovjek	Leukociti	EWAS	Numata i sur., 2015.

Također, epigenetička istraživanja pokazala su povezanost epigenetičkih promjena s pojavom shizofrenije, no potrebno je razjasniti točnu uzročno-posljedičnu vezu. Do sada, epigenetička su istraživanja dokazala utjecaj primjene antipsihotika na ekspresiju gena i potaknula su razmatranja o epigenetičkim terapijama koje bi mogle reaktivirati aberantno utišane

gene u shizofreniji. Razina mRNA i proteina vratila bi se na bazalnu i ublažili bi se ili poništili simptomi ove bolesti. Smatra se da bi inhibitori enzima DNMT1 i HDAC mogli poboljšati terapiju za shizofreniju (Večera i sur., 2017.).

Nekoliko se gena može istaknuti kao poveznica psihijatrijskih bolesti. Jedan od najviše istraživanih gena je *BDNF* koji ima centralnu ulogu u neuralnom razvoju i neuroplastičnosti. Njegova smanjena ekspresije, kao posljedica metiliranosti promotora, opažena je u depresiji, shizofreniji te ovisnosti o kokainu. Kod primjene kokaina, također je primjećeno povećanje ekspresije gena *Brdl* povezanog sa shizofrenijom i bipolarnim poremećajem. U ovisnosti najčeća je aberantna regulacija gena *Fosb*, *cFOS* i *Cdk5*, te tretman epigenetičkim inhibitorima ima veliki potencijal u terapiji na način da mijenja aberantnu u normalnu ekspresiju ovh gena .

Mnogo je još neistraženoga u psihijatrijskim bolestima i njihovoj epigenetičkoj osnovi. Važno je objasniti korake kroz koje neuralna aktivnost i sinaptički prijenosni signal do jezgre regulira enzime i druge proteine koji sudjeluju u epigenetičkim mehanizmima te kako okolina utječe na regulaciju tih mehanizama uzrokujući psihijatrijske bolesti.

5. LITERATURA

Abdolmaleky HM, Yaqubi S, Papageorgis P, Lambert AW, Ozturk S, Sivaraman V, Thiagalingam S., 2011. Epigenetic dysregulation of HTR2A in the brain of patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophr Res.* **129**, 183-90.

Abdolmaleky HM, Cheng KH, Faraone SV, Wilcox M, Glatt SJ, Gao F i sur., 2006. Hypomethylation of MB-COMT promoter is a major risk factor for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet* **15**, 3132–3145.

Akbarian, S., Ruehl, M.G., Bliven, E., Luiz, L.A., Peranelli, A.C., Baker, S.P., Roberts, R.C., i sur., 2005. Chromatin alterations associated with down-regulated metabolic gene expression in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* **62**, 829–840.

Bannister A J, Kouzarides T., 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**, 381–395

Berton, O. McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ. 2006. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311, 864–868

Bondy B., 2002. Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment. *Dialogues Clin Neurosci.* **4**, 7–20.

Callicott JH, Bertolino A, Mattay VS, Langheim FJ, Duyn J, Coppola R, Goldberg TE, Weinberger DR. 2000. Physiological dysfunction of the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia revisited. *Cereb Cortex.* **10**, 1078-92.

Chen, Y., Sharma, R.P., Costa, R.H., Costa, E., Grayson, D.R., 2002. On the epigenetic regulation of the human reelin promoter. *Nucleic Acids Res.* **30**, 2930–2939.

Covington, H.E., Maze, I. LaPlant, Q.C. Vialou, V.F. Ohnishi, Y.N. Berton, O. Fass, D.M. Renthal, W. Rush, A.J., Wu, E.Y. i sur. 2009. Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. *J. Neurosci.* **29**, 11451–11460.

D’Addario, C., Dell’Osso, B., Galimberti, D., Palazzo, M.C., Benatti, B., Di, F.A., Scarpini, E., Altamura, A.C., Maccarrone, M., 2013. Epigenetic modulation of BDNF gene in patients with major depressive disorder. *Biol. Psychiatry* **73**, e6–e7.

Everitt B.J., Robbins T.W., 2005. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci.* **8**, 1481-9.

Everitt, B. J. & Robbins, T. W, 2005. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nature Neurosci.* **8**, 1481–1489.

Freeman W.H., Lull M.E., Patel K.M., Brucklacher R.M., Morgan D. Roberts D.C.S., Vrana K.E., 2010. Gene expression changes in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens following abstinence from cocaine self-administration *BMC Neurosci.* **11**, 29.

Fryland T, Christensen JH, Pallesen J, Mattheisen M, Palmfeldt J, Bak M, Grove J, Demontis D, Blechingberg J, Ooi HS, Nyegaard M, Hauberg ME, Tommerup N, Gregersen N, Mors O, Corydon TJ, Nielsen AL, Børglum AD, 2016. Identification of the BRD1 interaction network and its impact on mental disorder risk. *Genome Med* **8**, 53

Gavin D.P., Sharma R.P., 2010. Histone modifications, DNA methylation, and schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev.* **34**, 882-8.

Gejman P.V., Sanders A.R., Duan J., 2010. The role of genetics in the etiology of schizophrenia. *Psychiatr Clin North Am.* **33**, 35-66

Goto, K., Numata, M., Komura, J.I., Ono, T., Bestor, T.H., Kondo, H., 1994. Expression of DNA methyltransferase gene in mature and immature neurons as well as proliferating cells in mice. *Differentiation* **56**, 39–44.

Guidotti, A., Auta, J., Davis, J.M., Di-Giorgi-Gerevini, V., Dwivedi, Y., Grayson, D.R., i sur., 2000. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch. Gen. Psychiatry* **57**, 1061–1069.

Hobara, T.; Uchida, S.; Otsuki, K.; Matsubara, T.; Funato, H.; Matsuo, K.; Suetsugi, M.; Watanabe, Y. 2010. Altered gene expression of histone deacetylases in mood disorder patients. *J. Psychiatr. Res.*, **44**, 263–270

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>, otvoreno 1.9.2017.

Huang HS, Akbarian S., 2007. GAD1 mRNA expression and DNA methylation in prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *PLoS One.* **2**, e809.

Ito R., Robbins TW, Everitt BJ., 2004. Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. *Nat Neurosci.* **7**, 389–397.

Iwamoto, K., Bundo, M., Yamada, K., Takao, H., Iwayama-Shigeno, Y., Yoshikawa, T., Kato, T., 2005. DNA methylation status of SOX10 correlates with its downregulation and oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia. *J. Neurosci.* **25**, 5376–5381.

Jenuwein, T., Allis, C.D., 2001. Translating the histone code. *Science*, 293, 1074–1080.

Kazantsev A.G., Thompson L.M., 2008. Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov.* **7**, 854-68.

Kelz M.B., Chen J., Carlezon W.A. Jr, Whisler K., Gilden L., Beckmann A.M., Steffen C, i sur., 1999. Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature.* **401**, 272-6.

Kumar A, Choi KH, Renthall W, Tsankova NM, Theobald DE, Truong HT, Russo SJ, Laplant Q, Sasaki TS, Whistler KN, Neve RL, Self DW, Nestler, 2005. Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron.* **48**, 303-14.

Lachner M, Jenuwein T., 2002. The many faces of histone lysine methylation. *Current Opinion in Cell Biology*, **14**, 286-98

Law, J.A., Jacobsen, S.E., 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 204–220.

Levine, A. A., Guan Z., Barco A., Xu S., Kandel E.R., Schwartz J.H., 2005. CREB-binding protein controls response to cocaine by acetylating histones at the fosB promoter in the mouse striatum. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 19186–19191

Li, J., Guo, Y., Schroeder, F.A., Youngs, R.M., Schmidt, T.W., Ferris, C., Konradi, C., Akbarian, S., 2004. Dopamine D2-like antagonists induce chromatin remodeling in striatal neurons through cyclic AMP-protein kinase A and NMDA receptor signaling. *J. Neurochem.* **90**, 1117–1131.

- Lu, L., Grimm, J.W., Shaham, Y., Hope, B.T., 2003. Molecular neuroadaptations in the accumbens and ventral tegmental area during the first 90 days of forced abstinence from cocaine selfadministration in rats. *J. Neurochem.* **85**, 1604–1613.
- Maher, B., 2008. Personal genomes: the case of the missing heritability. *Nature* **456**, 18–21.
- Margolis, R.L., Mcinnis, M.G., Rosenblatt, A., Ross, C.A., 1999. Trinucleotide repeat expansion and neuropsychiatric disease. *Arch. Gen. Psychiatry* **56**, 1019–1031.
- Mill, J., Tang, T., Kaminsky, Z., Khare, T., Yazdanpanah, S., Bouchard, L., Jia, P., Assadzadeh, i sur., 2008. Epigenomic profiling reveals DNA-methylation changes associated with major psychosis. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 696–711.
- Monteleone P, Maj M, Iovino M, Steardo L., 1990. GABA, depression and the mechanism of action of antidepressant drugs: a neuroendocrine approach. *J Affect Disord.* **20**, 1-5.
- Munari L, Provensi G, Passani MB, Galeotti N, Cassano T, Benetti F, Corradetti R, Blandina P., 2015. Brain Histamine Is Crucial for Selective Serotonin Reuptake Inhibitors' Behavioral and Neurochemical Effects. *Int J Neuropsychopharmacol.* **18**
- Murray K., 1964. The Occurrence of ϵ -N-Methyl Lysine in Histones. *Biochemistry*, **3**, 10–1
- Noh J. S., Sharma R. P., Veldic M., Salvacion A. A., Jia X., Chen Y., i sur. 2005. DNA methyltransferase 1 regulates reelin mRNA expression in mouse primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**, 1749–1754
- Numata S., Ishii K., Tajima A., Iga J., Kinoshita M., Watanabe S., Umehara H., Fuchikami M., Okada S., i sur., 2012. Blood diagnostic biomarkers for major depressive disorder using multiplex DNA methylation profiles: discovery and validation, *Epigenetics* **10**, 135—141

Oh DH, Park YC, Kim SH. 2010. Increased glycogen synthase kinase-3b mRNA level in the hippocampus of patients with major depression: a study using the stanley neuropathology consortium integrative database. *Psychiatry Investig* **7**, 202-7.

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., Li, E., 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247–257.

Paik W.K. i Kim S., 1969. Protein Methylation In Rat Brain In Vitro. *Journal of Neurochemistry* **16**, 1257-1261

Pandey SC, Ugale R, Zhang H, Tang L, Prakash A., 2008. Brain chromatin remodeling: a novel mechanism of alcoholism. *J Neurosci.* **28**, 3729–3737

Pascual M., Do Couto B.R., Alfonso-Loeches S., Aguilar M.A., Rodriguez-Arias M., Guerri C., 2012. Changes in histone acetylation in the prefrontal cortex of ethanol-exposed adolescent rats are associated with ethanol-induced place conditioning. *Neuropharmacology* **62**, 2309-19.

Perrier AL, Massoulié J, Krejci E., 2002. PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron* **33**, 275-85.

Preuss U., Landsberg G., Scheidtmann K.H., 2003. Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase, *Nucleic Acids Res.* **31**, 878-85.

Ritz M.C., Lamb R.J., Goldberg S.R., Kuhar M.J., 1987. Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science.* **237**, 1219-23.

Rogge A.R. i Wood A.W., 2013. The Role of Histone Acetylation in Cocaine-Induced Neural Plasticity and Behavior. *Neuropsychopharmacology.* **38**, 94–110.

Romieu P., Host L., Gobaille S., Sandner G., Aunis D., Zwiller J., 2008. Histone deacetylase inhibitors decrease cocaine but not sucrose self-administration in rats. *J Neurosci.* **28**, 9342-8

Sabunciyan S., Aryee M.J., Irizarry R.A., Rongione M., Webster M.J., Kaufman W.E., Murakami P., i sur., 2012. Genome-wide association study of major depressive disorder: new results, meta-analysis, and lessons learned. *Mol Psychiatry*. **17**, 36-48.

Sadakierska-Chudy A., Frankowska M., Jastrzębska J., Wydra K., Miszkiet J., Sanak M., Filip M., 2017. Cocaine Administration and Its Withdrawal Enhance the Expression of Genes Encoding Histone-Modifying Enzymes and Histone Acetylation in the Rat Prefrontal Cortex. *Neurotoxicity Research*. **32**, 141–150

Sadri-Vakili G., Kumaresan V., Schmidt H.D., Famous K.R., Chawla P., Vassoler F.M., i sur., 2010. Cocaine-induced chromatin remodeling increases brain-derived neurotrophic factor transcription in the rat medial prefrontal cortex, which alters the reinforcing efficacy of cocaine. *J Neurosci*. **30**, 11735-44.

Schroeder F.A., Tonya M. Gilbert, Ningping Feng, Brendan D. Taillon,† Nora D. Volkow, Robert B. Innis, Jacob M. Hooker, and Barbara K. Lipska, 2017. Expression of HDAC2 but Not HDAC1 Transcript Is Reduced in Dorsolateral Prefrontal Cortex of Patients with Schizophrenia. *ACS Chem Neurosci*. **8**: 662–668.

Severinsen JE, Bjarkam CR, Kiær-Larsen S, Olsen IM, Nielsen MM, Blechingberg J, Nielsen AL, Holm IE, Foldager L, i sur., 2006. Evidence implicating BRD1 with brain development and susceptibility to both schizophrenia and bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry* **11**, 1126–1138

Sharma, R.P., Grayson, D.R., Gavin, D.P., 2008. Histone deacetylase 1 expression is increased in the prefrontal cortex of schizophrenia subjects: analysis of the National Brain Databank microarray collection. *Schizophr. Res.* **98**, 111–117

Strahl BD, Allis CD., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41–45.
Sutter, D., Doerfler, W., 1980. Methylation of integrated adenovirus type 12 DNA sequences in transformed cells is inversely correlated with viral gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 253–256.

Sweatt, J.D, Nestler, E. J., Meaney M. J., Akbarian S., 2013., Epigenetic Regulation in the Nervous System: Basic Mechanisms and Clinical Impact, Elsevier, *Oxford*, pp 3-33

Tadić A., Müller-Engling L., Schlicht K.F., Kotsiari A., Dreimüller N., Kleimann A., Bleich S., Lieb K., Frieeling H. 2014. Methylation of the promoter of brain-derived neurotrophic factor exon IV and antidepressant response in major depression. *Molecular Psychiatry* **19**, 281-283

Tamura, Y., Kunugi, H., Ohashi, J., Hohjoh, H., 2007. Epigenetic aberration of the human REELIN gene in psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry* **12**, 593–600.

Torrey, E.F., Barci, B.M., Webster, M.J., Bartko, J.J., Meador-Woodruff, J.H., Knable, M.B., 2005. Neurochemical markers for schizophrenia, bipolar disorder, and major depression in postmortem brains. *Biol. Psychiatry* **57**, 252–260.

Trullas R, Skolnick P., 1990. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur J Pharmacol.* **185**, 1-10.

Tsankova N., Renthal W., Kumar A. Nestler E.J., 2007. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci.* **8**, 355-67.

Tsankova, N. M., Berton O., Renthal W., Kumar A., Neve R.L., Nestler E.J., 2006. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nature Neurosci.* **9**, 519–525

Voltz, K., Trylska, J., Calimet, N., Smith, J.C., Langowski, J., 2012. Unwrapping of nucleosomal DNA ends: a multiscale molecular dynamics study. *Biophys. J.* **102**, 849–858.

Waddington, C.H., 1942. Epigenotype. *Endeavour* **1**, 18–21

Weiss J.M., Goodman P.A., Losito B.G., Corrigan S., Charry J.M., Bailey W.H., 1981. Behavioral Depression Produced By An Uncontrollable Stressor: Relationship To Norepinephrine, Dopamine, And Serotonin Levels In Various Regions Of Rat Brain. *Brain Research Reviews*, **3**, 167-205

WHO, I. C. P. E., 2000. Cross-national comparisons of the prevalences and correlates of mental disorders. *WHO International Consortium in Psychiatric Epidemiology. Bull. World Health Organ.* **78**, 413–426.

Wray NR, Pergadia ML, Blackwood DH, Penninx BW, Gordon SD, Nyholt DR, i sur., 2012. Genome-wide association study of major depressive disorder: new results, meta-analysis, and lessons learned. *Mol Psychiatry*. **17**, 36-48.

6. SAŽETAK

Epigenetika podrazumijeva regulaciju aktivnosti gena koja ne dovodi do promjene DNA sekvence. Ekspresija gena je epigenetički kontrolirana preko nasljednih, potencijalno reverzibilnih promjena u molekuli DNA i histonskim proteinima. Te promjene uključuju metilaciju DNA i modifikacije histonskih repova kao što su fosforilacija, acetilacija, metilacija, ubikvitinacija ili ADP-ribozilacija. Epigenetičke promjene dinamičnije su od promjena u sekvenci DNA i pod utjecajem su okoline. Istraživanja utjecaja epigenetičkih promjena na razvoj psihijatrijskih bolesti doprinose boljem razumijevanju ovih bolesti te razvoju novih, poboljšanih terapija. Ponajviše se istaknula terapija inhibitorima histonskih acetilaza i DNA metiltransferaza. Istraživanja su pokazala da se njihovom upotrebom može vratiti aberantna ekspresija kandidat gena, prisutna u bolesti, na normalnu razinu prisutnu u zdravih ljudi. Stoga se može zaključiti da okoliš djeluje u patofiziologiji psihijatrijskih bolesti kroz promjenu ekspresije gena posredovanu epigenetičkim mehanizmima.

7. SUMMARY

Epigenetics refers to the regulation of gene activity that does not lead to a change of DNA sequence. Gene expression is epigenetically controlled via heritable, but potentially reversible, changes in modification of DNA molecule and histone proteins. Those changes include DNA methylation and histone tails modification such as phosphorylation, acetylation, methylation, ubiquitination or ADP-ribosylation. Epigenetic alterations are more dynamic than alterations in DNA sequence, and under the influence of the environment. Studies of effect of epigenetic alterations involved in psychiatric diseases lead to better understanding of these diseases and development of new, improved therapies. Most of all, HDAC and DNA methyltransferase inhibitors have been highlighted. Studies had shown that aberrant expression of gene candidate, present in disease, can be restored back to normal level present in healthy people by administration of these drugs. Therefore, it can be concluded that environment affects pathophysiology of psychiatric diseases by changes of gene expression mediated by epigenetic mechanisms.